

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 22, 1984, pp. 483–487

Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten im Liquor bei Multipler Sklerose und nichtentzündlichen Erkrankungen des Nervensystems

Von H.-J. Schädlich, Y. Bliersbach

Neurologisch-Psychiatrische Forschungsabteilung der Univ.-Nervenklinik Köln

K. Felgenhauer

Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Göttingen und

M. Schifferdecker

Neurologisch-Psychiatrische Forschungsabteilung der Univ.-Nervenklinik Köln

(Eingegangen am 8. Februar/30. März 1984)

Zusammenfassung: Im Liquor von 208 Patienten wurden immuncytochemisch IgG synthetisierende Lymphocyten dargestellt. Diese Zellen waren bei 59 von 111 Kranken mit Multipler Sklerose nachweisbar. Die Häufigkeit ihres Auftretens war unabhängig von der Verlaufsform der Erkrankung, es fanden sich jedoch Beziehungen zur Krankheitsdauer und zur Ausprägung der Krankheitserscheinungen. Beim Vergleich zwischen laser-nephelometrischer Untersuchung von Serum und Liquor sowie Liquorzell Diagnostik fiel auf, daß bei 12% der Erkrankten IgG synthetisierende Lymphocyten vorkamen, ohne daß eine lokale IgG-Synthese im Nervensystem nachweisbar war. Hierbei handelte es sich vorwiegend um sehr kurze Krankheitsverläufe. Bei keinem von 97 Patienten mit nichtentzündlichen Erkrankungen des Nervensystems fanden sich IgG synthetisierende Lymphocyten im Liquor.

Occurrence of immunoglobulin G-synthesizing lymphocytes in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis and non-inflammatory diseases of the nervous system

Summary: In 208 patients, the IgG-synthesizing lymphocytes of the CSF were demonstrated with immunocytochemical methods. These cells were found in 59 of 111 patients with multiple sclerosis. Their frequency of appearance was dependent on the duration of the disease and its clinical severity. A comparative laser-nephelometric examination of serum and CSF, together with CSF cell diagnosis, demonstrated that IgG-synthesizing lymphocytes were present in 12% of the patients without simultaneous local IgG production within the CNS. These cases showed mostly very short clinical courses. IgG-synthesizing lymphocytes were absent from the CSF of 97 patients with non-inflammatory diseases of the nervous system.

Einführung

Die Liquorzell Diagnostik ist ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel bei neoplastischen und entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems. Durch die übliche panoptische Färbung der Präparate nach

Pappenheim gelingt jedoch nur eine beschränkte Zelldifferenzierung, insbesondere ist keine Darstellung der Lymphocyten subpopulationen möglich. Auch histochemische Färbemethoden erschließen keine wesentlich darüber hinausgehenden diagnosti-

schen Möglichkeiten. Erst immuncytochemische Verfahren erlauben es, morphologisch gleichartige Zellen zu differenzieren. So ist es möglich, durch den Nachweis von intralymphocytärem Immunglobulin (1, 2) eindeutig Antikörper synthetisierende B-Lymphocyten zu charakterisieren. Diese Zellen wurden bei entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems beschrieben (1–3). Strittig ist, ob diese Immunglobulin G synthetisierenden Lymphocyten auch normaler Bestandteil des Liquors sind oder ausschließlich bei Erkrankungen des Nervensystems auftreten. Um zur Beantwortung dieser Frage beizutragen, wurden 97 Liquores von Patienten mit nichtentzündlichen Erkrankungen untersucht. Als Vergleichsgruppe dienten 111 Patienten mit Multipler Sklerose. Weiterhin versuchten wir, bei diesen Kranken Beziehungen zwischen klinischen Parametern und dem Auftreten von Immunglobulin G synthetisierenden Lymphocyten im Liquor darzustellen.

Material und Methoden

Von 208 Patienten wurde der lumbal entnommene Liquor untersucht. Bei 111 Kranken war auf Grund der Anamnese sowie des charakteristischen klinischen Bildes die Diagnose einer Multiplen Sklerose gestellt worden. 62 Kranke litten an nichtentzündlichen Erkrankungen des Nervensystems, davon 17 an hirnigen Tumoren, 25 an cerebralen Gefäßprozessen und 20 an degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule. In 35 Fällen ergab sich kein Hinweis für eine Erkrankung des Nervensystems.

Bei allen Patienten wurden unmittelbar nach der Liquorentnahme und Bestimmung der Leukocytenzahl im Liquor in der *Fuchs-Rosenthal* Kammer (4) Zellpräparate nach der von *Watson* (5) beschriebenen Methode mit der Zytozentrifuge angefertigt (Shandon-Elliott, 1500 min⁻¹ für 5 min). Ein Präparat wurde nach *Pappenheim* gefärbt, die Darstellung IgG synthetisierender Lymphocyten erfolgte immuncytochemisch:

Die Präparate wurden für 4 min in Methanol fixiert, anschließend in Phosphatpuffer von pH 7,2 gespült. In der feuchten Kammer wurden die Zellen dann mit 5 mg/l Peroxidase-gekoppelten anti-human-IgG-Antikörpern vom Kaninchen (*Kirkegaard und Perry*, Gaithersburg/Maryland) bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Nach erneutem Spülen erfolgte die Färbung der Peroxidase nach *Graham & Karnovsky* (6). 10 mg Diaminobenzidin wurden in 40 ml 0,05 mol/l Tris-HCl Puffer gelöst. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 4 µl H₂O₂ (Perhydrol 300 g/kg Merck/Darmstadt) zugegeben, die Färbezeit betrug 10 min, als Gegenfärbung diente Haematoxylin. Bei einem Teil der Färbungen wurden nach einer eigenen Methode (3) selbst präparierte Antikörper eingesetzt. Alle Präparate wurden vollständig durchgesehen. Falls Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten dargestellt waren, wurden diese auf 200 Lymphocyten ausgezählt.

Die Auswertung der anamnestischen und klinischen Daten der Patienten erfolgte anhand der vorliegenden Krankenblattunterlagen, die Schwere der Ausfälle bei den Multiple Sklerose-Kranken wurde nach dem von *Poser et al.* (7) angegebenen Schema quantifiziert. Bei 86 Patienten mit Multipler Sklerose wurde neben der Liquorzellendifferenzierung eine laser-nephelometrische Albumin- und IgG-Bestimmung in Serum und Liquor vorgenommen (8).

Ergebnisse

Mit Hilfe der beschriebenen immuncytochemischen Methode ließ sich bei einem Teil der untersuchten Liquores eine deutliche intrazelluläre Anfärbung von Lymphocyten nachweisen (Abb. 1), monocytoiden Zellen zeigten keine Reaktion. Es ergaben sich im Einzelnen die in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse. Bei keinem Patienten mit einer nichtentzündlichen Erkrankung waren im Liquor Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten nachweisbar. Dagegen konnten diese Zellen bei 59 von 111 Kranken mit Multipler Sklerose dargestellt werden. Ihr durchschnittlicher Anteil, bezogen auf die Lymphocytenzahl, betrug 1,4%. Wie aus der Tabelle weiter hervorgeht, wiesen die Patienten mit nichtentzündlichen Erkrankungen eine höhere durchschnittliche Liquorzellzahl (19) auf als die an Multipler Sklerose Erkrankten (13). Bei diesen war die durchschnittliche Zellzahl bei Kranken mit Immunglobulin G synthetisierenden Lymphocyten im Liquor höher (15; 1–51) als bei denjenigen ohne Nachweis dieser Zellen (10; 1–64). Die Differenz war statistisch signifikant (Rangsummentest nach *Wilcoxon*, $p < 0,01$).

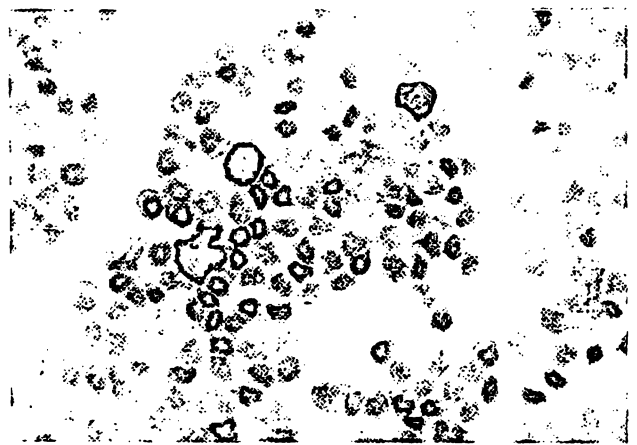


Abb. 1. Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten im Liquor. Darstellung mit Peroxidase-markiertem Antikörper gegen menschliches IgG vom Kaninchen, Gegenfärbung Haematoxylin.

Der Krankheitsverlauf war bei 41 Patienten mit Multipler Sklerose schubförmig, bei 23 chronisch progredient. Bei 47 weiteren Kranken waren die ersten Symptome erst Tage oder wenige Wochen vor der hier durchgeführten Untersuchung aufgetreten. Wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, waren bei diesen Patienten geringfügig häufiger Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten nachweisbar als bei den beiden anderen Verlaufstypen. Von 41 Patienten mit schubförmiger Krankheitsentwicklung

Tab. 1. Durchschnittliche Liquorzellzahl und Anzahl der Kranken mit IgG synthetisierenden Lymphocyten im Liquor bei 208 Patienten. In Klammern die jeweils ermittelten niedrigsten und höchsten Werte.

Diagnose	Liquorzellzahl \bar{x}	Anzahl der Pat. mit IgG synthet. Lymphocyten im Liquor
Neurol.-Psychiat. Befund unauffällig n = 35	5 (1-40)	0
Hirneigene Tumoren n = 17	31 (1-430)	0
Cerebrale Gefäß- prozesse n = 25	36 (1-500)	0
Degenerative Wirbel- säulenerkrankungen n = 20	10 (1-109)	0
Multiple Sklerose n = 111	13 (1-64)	59

Tab. 2. Durchschnittliche Liquorzellzahl und Anzahl der Kranken mit IgG synthetisierenden Lymphocyten im Liquor bei unterschiedlichen Verlaufsformen von Multipler Sklerose.

Verlaufsform der Erkrankung	Liquorzellzahl \bar{x}	Anzahl der Pat. mit IgG synthet. Lymphocyten im Liquor
Schubförmig n = 41	11 (1-47)	21 (51%)
Chronisch pro- gredient n = 23	10 (1-26)	11 (48%)
Erster Krankheits- schub n = 47	16 (1-64)	28 (60%)

Tab. 3. Durchschnittliche Liquorzellzahl und Anzahl der Kranken mit IgG synthetisierenden Lymphocyten im Liquor bei unterschiedlicher Krankheitsdauer. 111 Patienten mit Multipler Sklerose.

Krankheitsdauer (Jahre)	Liquorzellzahl \bar{x}	Anzahl der Pat. mit IgG synthet. Lymphocyten im Liquor
<1 n = 53	16 (1-64)	32 (60%)
1-5 n = 39	12 (2-40)	22 (56%)
>5 n = 19	7 (1-26)	5 (26%)

war bei 33 zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Exazerbation der Erkrankung zu beobachten. In diesen Fällen fanden sich bei 55% Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten im Liquor, bei 8 Kranken ohne akuten Schub lediglich bei 25%.

Sowohl die Häufigkeit des Auftretens von Immunglobulin G synthetisierenden Lymphocyten im Liquor als auch die Zellzahl wiesen Beziehungen zur Krankheitsdauer auf (Tab. 3). Während bei kurzen Verläufen der Anteil von Patienten mit Immunglobulin G synthetisierenden Lymphocyten und die durchschnittliche Liquorzellzahl am höchsten waren, nahmen diese Werte bei einer Krankheitsdauer über 5 Jahren bis auf etwa die Hälfte ab. Ähnliche Beziehungen waren auch zwischen der Schwere der Erkrankung und der Häufigkeit des Auftretens von Immunglobulin G synthetisierenden Lymphocyten nachweisbar (Tab. 4), wobei bei Erkrankten mit schweren Ausfällen diese Zellpopulation seltener als bei den Vergleichsgruppen nachweisbar war. Zwischen dem Lebensalter der Patienten und der Häufigkeit von Immunglobulin G synthetisierenden Lymphocyten waren keine Beziehungen erkennbar.

Tab. 4. Anzahl von Patienten mit IgG synthetisierenden Lymphocyten im Liquor und Krankheitsdauer bei unterschiedlicher Schwere der Ausfälle. 111 Patienten mit Multipler Sklerose.

Schwere der Erkrankung	Anzahl der Pat. mit IgG synthet. Lymphocyten im Liquor	Krankheitsdauer (Jahre)
0-5 n = 54	30 (56%)	1,6 (0,002-18)
6-10 n = 37	22 (59%)	4,0 (0,002-20)
>10 n = 20	7 (35%)	5,3 (0,04-33)

Bei 86 der untersuchten Patienten mit Multipler Sklerose wurde neben der Liquorzell Diagnostik eine laser-nephelometrische Untersuchung von Serum und Liquor vorgenommen. Es ergab sich keine sichere Korrelation zwischen der Anzahl von Immunglobulin G synthetisierenden Lymphocyten und der Menge des lokal im Nervensystem synthetisierten IgG (Korrelationskoeffizient 0,34).

Bei 42 Kranken (49%) waren sowohl Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten als auch eine lokale Synthese von IgG innerhalb des Nervensystems nachweisbar. Bei 21 Patienten (24%) war eine ortsständige Immunglobulinsynthese festzustellen, obwohl sich keine Immunglobulin G synthetisieren-

den Lymphocyten nachweisen ließen. Umgekehrt gelang der Nachweis dieser Zellen bei 10 Patienten (12%), ohne daß die laser-nephelometrische Untersuchung einen Anhalt für eine lokale IgG-Synthese bot. Bei 13 Patienten (15%) waren weder aktivierte Lymphocyten noch lokal synthetisierte Immunglobuline nachweisbar.

Beim Vergleich von Lebensalter, Krankheitsdauer sowie Schwere der Erkrankung (Tab. 5) fiel eine geringe Krankheitsdauer bei den Patienten auf, die lediglich Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten im Liquor aufwiesen. Bei statistischer Analyse (Wilcoxon-Test) war jedoch keine Signifikanz dieser Differenz zu belegen.

Tab. 5. Krankheitsdauer, Schwere der Ausfälle und Lebensalter bei unterschiedlichem laser-nephelometrischem und immuncytochemischem Liquorbefund. 86 Patienten mit Multipler Sklerose.
(IgG_{loc} + = lokale IgG-Synthese im Liquorraum, IgG_{loc} - = kein Nachweis von lokal synthetisiertem IgG. IsLy + = Nachweis von IgG synthetisierenden Lymphocyten im Liquor, IsLy - = kein Nachweis von IgG synthetisierenden Lymphocyten im Liquor.)

Liquorbefund	Krankheitsdauer (Jahre)	Schwere der Erkrankung	Lebensalter (Jahre)
IgG _{loc} + IsLy + n = 42	2,6 (0,002-15)	5,8 (1-15)	34 (15-56)
IgG _{loc} + IsLy - n = 21	5,8 (0,01 -33)	9,6 (0-26)	34 (20-54)
IgG _{loc} - IsLy + n = 10	0,2 (0,002-1)	5,6 (1-15)	31 (18-42)
IgG _{loc} - IsLy - n = 13	0,9 (0,004-4)	5,7 (0-16)	28 (18-37)

Diskussion

Die Multiple Sklerose ist eine entzündliche Erkrankung bisher ungeklärter Ätiologie. Als Ausdruck einer humoralen Immunantwort kann bei den meisten Betroffenen lokal im Nervensystem synthetisiertes IgG nachgewiesen werden. Darüber hinaus finden sich im Liquorsediment häufig Plasmazellen und transformierte Lymphocyten - sogenannte lymphoide Zellen - die auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen nachweisbar sind. Hierbei handelt es sich offenbar teilweise um IgG synthetisierende B-Lymphocyten. Auf Grund der von uns erhobenen Befunde und der Ergebnisse anderer Untersucher

(9) dürfen wir folgern, daß diese Zellart bei entzündlichen Prozessen im Liquorraum nachweisbar ist, nicht jedoch bei Erkrankungen, die zu keiner humoralen Immunantwort führen. Wir können auf Grund der vorliegenden Untersuchungen die Vermutung von *Tourtellotte* (10) nicht bestätigen, daß immunologisch aktive Lymphocyten normale Bestandteile des Liquors sind und die Häufigkeit ihres Auftretens lediglich von der Liquorzellzahl abhängt.

Ähnlich wie von *Olischer* (11) für Plasmazellen sowie von *Schlote & Roos* (12) für lymphoide Zellen im Liquor bei Kranken mit Multipler Sklerose beschrieben, änderte sich die Häufigkeit des Auftretens von Immunglobulin G synthetisierenden Lymphocyten bei unterschiedlichen Verlaufsformen der Erkrankung kaum. Deutliche Differenzen fanden sich dagegen bei Berücksichtigung der Krankheitsdauer. Patienten, deren erste Symptome vor weniger als einem Jahr aufgetreten waren, wiesen sowohl am häufigsten Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten als auch die höchsten Zellzahlen im Liquor auf. Dies korreliert mit Beobachtungen von *Esiri* (1) an Hirngewebe. Sie fand in frischen Entmarkungsherden ausgeprägte lymphocytäre Infiltrate mit zahlreichen IgG synthetisierenden Zellen, während bei älteren Veränderungen sowohl ein Rückgang der Rundzellen als auch eine Verminderung von Immunglobulin G synthetisierenden Lymphocyten zu beobachten war. Dies zeigt, daß es beim Auftreten frischer Entmarkungsherde zu einer erheblichen Einwanderung von Lymphocyten in das Hirnparenchym kommt, von denen offenbar nur ein geringer Teil in den Liquorraum gelangt und dort nachweisbar ist. Beim Abklingen der akuten Krankheitsphase ist somit eine weitgehende Normalisierung des Liquorzellbildes zu erwarten. Die in das Hirngewebe eingewanderten Lymphocyten sind als Syntheseort der lokal produzierten Immunglobuline anzusehen, so daß - wie bereits von *Tourtellotte* (13) dargestellt - keine Beziehungen zwischen der Menge der ortsständig synthetisierten Immunglobuline und der Anzahl von Immunglobulin G synthetisierenden Lymphocyten im Liquor zu erwarten sind.

Vorwiegend bei sehr kurzer Krankheitsdauer besteht die Möglichkeit, daß zwar bereits Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten in das Hirnparenchym eingewandert sind, die von ihnen gebildete Antikörpermenge jedoch noch so gering ist, daß sie sich dem Nachweis entzieht. Wir beobachteten insgesamt 10 Patienten mit sehr kurzer Krankheitsdauer, bei denen zwar Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten, jedoch keine typischen Proteinveränderungen im Liquor nachweisbar waren.

Unsere Untersuchung zeigt, daß Immunglobulin G synthetisierende Lymphocyten bei etwa der Hälfte der Kranken mit Multipler Sklerose, jedoch nicht bei Patienten mit nichtentzündlichen Erkrankungen des Nervensystems nachweisbar sind. Die Häufigkeit ih-

res Auftretens im Liquor ist offenbar abhängig von der Akuität der Erkrankung. Besonders bei kurzen Verläufen kann ihr Nachweis diagnostisch hilfreich sein und die Liquorproteinuntersuchungen sinnvoll ergänzen.

Literatur

1. Esiri, M. (1980) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 6, 9–21.
2. Guseo, A. (1974) *Neuropathol. Pol.* 2, 281–284.
3. Schädlich, H.-J., Nekic, M. & Felgenhauer, K. (1980) *J. Neurol.* 224, 77–87.
4. Hallmann, L. (1980) *Klinische Chemie und Mikroskopie*, 11. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
5. Watson, P. (1966) *J. Lab. Clin. Med.* 68, 494–501.
6. Graham, R. C. & Karnovsky, M. J. (1966) *J. Histochem. Cytochem.* 14, 291–302.
7. Poser, S., Hauptvogel, H. & Bauer, H. J. (1973) *Z. Neurol.* 204, 301–308.
8. Felgenhauer, K., Hansen, Chr. & Remy, A. (1982) *Med. Lab.* 11, 48–57.
9. Forsberg, P. & Kam-Hansen, S. (1983) *Scand. J. Immunol.* 17, 531–537.
10. Tourtellotte, W. (1970) Multiple sclerosis cerebrospinal fluid. In: *Handbook of clinical neurology*, (Hrsg. Vinken, P. J. & Bruyn, G. W.) North-Holland Publ. Comp.
11. Olischer, R. M. (1978) *Arch. Geschwulstforsch.* 48, 401–406.
12. Schlote, E. & Roos, W. (1974) *Nervenarzt* 45, 576–587.
13. Tourtellette, W. (1970) *J. Neurol. Sci.* 10, 279–304.

Dr. H.-J. Schädlich
Neurologisch-Psychiatrische
Forschungsabteilung der
Universitäts-Nervenklinik
Joseph-Stelzmann-Straße 9
D-5000 Köln 41

